

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Shou TAKASHIMA et al.

Appl. No: : Not Yet Assigned (U.S. National Phase of PCT/JP03/00883) **PCT Branch**

Filed : Concurrently Herewith (I.A. Filed January 30, 2003)

For : SUGAR CHAIN SYNTHASES

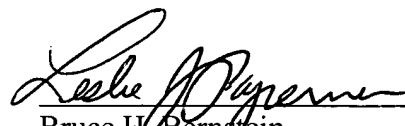
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application Nos. 2002-21159, filed January 30, 2002; and 2002-122673, file April 24, 2002. The International Bureau already should have sent certified copies of the Japanese applications to the United States designated office. If the certified copies have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Shou TAKASHIMA et al.

 Reg. No. 29,027
33,329

July 28, 2004
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

BEST AVAILABLE COPY

10 Rec-17377

29 JUL 2003 JP 03/00883

日 本 国 特 許 庁 20.01.03
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 4月24日

REC'D 28 MAR 2003

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-122673

[ST.10/C]:

[JP2002-122673]

出 願 人
Applicant(s):

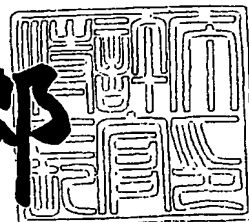
理化学研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月11日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3015526

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 A21272A
【提出日】 平成14年 4月24日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号理化学研究所内

【氏名】 高島 晶

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号理化学研究所内

【氏名】 辻本 雅文

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県秦野市室町 2 - 2 6

【氏名】 辻 崇一

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成 1 4 年 4 月 1 2 日提出の包括委任状提出書に添付の

2002-122673

ものを援用する。

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖合成酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

【請求項2】 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

【請求項3】 請求項2に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子。

【請求項4】 下記の何れかの塩基配列を有する請求項3に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

【請求項5】 請求項3または4に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

【請求項6】 発現ベクターである、請求項5に記載の組み換えベクター。

【請求項7】 請求項5または6に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項1または2に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項1または2に記載の酵素の製造方法。

【請求項9】 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

【請求項10】 請求項1または2に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

【請求項11】 請求項9又は10に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項12】 請求項11に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。

【請求項13】 発現ベクターである、請求項12に記載の組み換えベクター。

【請求項14】 請求項12または13に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項15】 請求項14に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項9または10に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項9または10に記載の蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は糖鎖合成酵素および該酵素をコードするDNAに関するものである。さらに詳しくは、本発明はオリゴ糖などの糖鎖のうち、末端にGal β 1,4GlcNAc (Gal: ガラクトース、GlcNAc: N-アセチルグルコサミン) 構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2,6の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素 (ST6Gal II) および該酵素をコードするDNAに関するものである。本発明の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための試薬、その他、酵素阻害剤等として有用である。

【0002】

【従来技術】

シアル酸は、たとえば細胞-細胞間伝達、細胞基質相互作用、細胞接着などの重要な生理作用を司る物質である。発生、分化の過程に特異的な、あるいは臓器特異的なシアル酸含有糖鎖の存在が知られている。シアル酸は糖タンパク質および糖脂質の糖鎖部分の末端位置に存在しており、これらの部位へのシアル酸の導入は、酵素的にCMP-Siaからの転移によってなされる。このシアル酸の酵素的導入 (シアル酸転移) を担う酵素は、シアル酸転移酵素(sialyltransferase)と呼ばれるグリコシルトランスフェラーゼ類である。

【0003】

哺乳類では現在までに19種類のシアル酸転移酵素の存在が知られているが、これらはシアル酸の転移様式から4つのファミリーに大別される (Tsuji, S. (1996) J. Biochem. 120, 1-13)。すなわち、 α 2,3の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する β -ガラクトシド α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal-ファミリー)、 α 2,6の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素(ST6Gal-ファミリー)、 α 2,6の結合様式でN-アセチルガラクトサミンにシアル酸を転移するGalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素(ST6GalNAc-ファミリ

一)、 および $\alpha 2,8$ の結合様式でシアル酸にシアル酸を転移する $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素(ST8Sia-ファミリー)である。このうち β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素については現在までに 1 種類の酵素 (ST6Gal I) についてのみ cDNA クローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかになっている (Hamamoto, T. and Tsuji, S. (2001) ST6Gal-I in Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (Taniguchi, N. et al. Eds.) pp295-300)。

【0004】

ST6Gal I は糖タンパク質、オリゴ糖またはガングリオシドなどの糖鎖部分に Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal $\beta 1,4$ Glc) や場合によっては Gal $\beta 1,3$ GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。基質特異性が広いということは、例えば ST6Gal I を利用した機能性オリゴ糖などの合成の際に、原材料に不純物が混入していると、それらも基質となって副産物が生じてしまう可能性が考えられる。従ってこの問題を解決するためには、基質特異性に関してより選択性の高い酵素が要求される。しかし現在までに β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素活性をもち、基質特異性に関してより選択性の高い哺乳動物由来の酵素は知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記した通り、哺乳動物で今までに知られている β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素は 1 種類 (ST6Gal I) だけである。これは糖タンパク質、オリゴ糖またはガングリオシドなどの糖鎖部分に Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal $\beta 1,4$ Glc) や場合によっては Gal $\beta 1,3$ GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。本発明は、この基質特異性が広いという問題点を解決し、オリゴ糖上の Gal $\beta 1,4$ GlcNAc 構造に対してより選択性の高い基質特異性を示す新規 β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素および該酵素をコードする DNA を提供することを解決すべき課題とした。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討し、先ず、ヒトシアル酸転移酵素ST6Gal Iのアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンをexpressed sequence tag (dbEST)のデータベースで検索し、GenBankTM accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052の各ESTクローンを取得した。またそれらの塩基配列情報を利用して、dbESTとヒトゲノムのHigh throughput genomic sequenceのデータベースを検索し、関連ESTクローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報を取得した。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR)用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来cDNAを鋳型としてPCRを行い、得られた増幅断片と入手ESTクローン由来のDNA断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを取得した。そして、該クローンによりコードされるタンパク質が β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有していることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0007】

即ち、本発明によれば、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

【0008】

本発明の別の態様によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸

の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

【0009】

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、下記の何れかの塩基配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

【0010】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする、本発明の酵素の製造方法が提供される。

【0011】

本発明のさらに別の態様によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

【0012】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

【0013】

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の蛋白質を採取することを特徴とする、本発明の蛋白質の製造方法が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

(1) 本発明の酵素及び蛋白質

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

【0015】

上記した作用及び基質特異性は、本明細書に記載した実施例で取得されたヒト大腸由来の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の由来はヒト由来のものに限定されるものではなく、同型の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらの β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

【0016】

このような β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、上記した作用および基質特異性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

【0017】

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

【0018】

さらに、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られる β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号 1 に記載したアミノ酸配列の 33～529 により特定される β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができる。また、配列表の配列番号 1 に記載したアミノ酸配列の 31～200 前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号 1 に記載したアミノ酸配列の 201～529 の領域を β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

【0019】

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

【0020】

本明細書で言う「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

【0021】

本発明の酵素又は蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを手に入れることが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列、及び配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて適当なcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の酵素をコードするDNAを取得することができる。

例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAを単離する方法は以下の実施例に詳細に説明されている。もっとも、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAの単離方法はこれらの方法に限定されることはなく、当業者は下記の実施例に記載された方法を参照しつつ、この方法を適宜修飾ないし変更することにより、容易に目的のcDNAを単離することができる。

【0022】

また、本発明の酵素をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の酵素をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の酵素を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0023】

さらに、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質も本発明に含まれる。

【0024】

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、発現後に細胞内に留まり、細胞外に分泌されない場合がある。また、細胞内濃度が一定以上になると、酵素の発現量が低下するという可能性がある。上記の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移活性を有効に利用するために、本酵素の活性を維持し、かつ発現時に細胞から分泌される可

溶性形態の蛋白を製造することができる。このような蛋白としては、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性に関与する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する蛋白質を挙げるができる。例えば、マウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドや、プロテインAとの融合蛋白は本発明の分泌型蛋白の好ましい態様である。

【0025】

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、 NH_2 末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム(stem)領域、及び COOH -末端の大きな活性ドメインを有する(Paulson, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem., 264, 17615-17618, 1989)。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の経膜ドメインの位置を調べるためには、カイト及びドゥーリトル(Kyte, J. and Doolittle, R.F., J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982)の方法に従って作成した疎水性分布図を利用することができる。また、活性ドメイン部分の推定には、各種のフラグメントを導入した組換えプラスミドを作成して利用することができる。このような方法の一例は、例えばPCT/JP94/02182号の明細書に詳細に記載されているが、経膜ドメインの位置の確認や活性ドメイン部分の推定方法は、この方法に限定されることはない。

【0026】

β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白の製造のためには、例えばシグナルペプチドとして免疫グロブリンシグナルペプチド配列を用い、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインに対応する配列を該シグナルペプチドにインフレーム融合させればよい。このような方法としては、例えば、ジョブリンの方法(Jobling, S.A. and Gehrke, L., Nature(Lond.), 325, 622-625, 1987)を利用することができる。また、本明細書の実施例に説明されているように、マウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドやプロテ

ンAとの融合蛋白を製造してもよい。もっとも、シグナルペプチドの種類やシグナルペプチドと活性ドメインの結合方法、または可溶化の方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分を適宜選択することができるし、それらを利用可能な任意のシグナルペプチドと適宜の方法により結合することにより細胞外分泌型の蛋白を製造することができる。

【0027】

(2) 本発明の遺伝子

本発明によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子が提供される。

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

【0028】

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0029】

さらに、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインから成る蛋白質、並びに該活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シア

ル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に属する。

【0030】

本発明の遺伝子の取得方法は上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

【0031】

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明の遺伝子は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の遺伝子は、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

【0032】

細菌細胞で作動可能なプロモーターとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(Bacillus licheniformis α -amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス

・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(*Bacillus subtilis* alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp*若しくは*tac*プロモータなどが挙げられる。

【0033】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子)プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TPI1プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは*t p i A*プロモータなどがある。

【0034】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTPI1ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

【0035】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マ-

カーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはシゾサッカロマイセス・ポンベ T P I 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはハイグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明の DNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

【0036】

(4) 本発明の形質転換体及びそれを用いた蛋白質の製造

本発明の DNA 又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明の DNA または組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明の DNA 構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

【0037】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293 細胞、HeLa 細胞、COS 細胞、BHK 細胞、CHL 細胞またはCHO 細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入された DNA 配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【0038】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が

挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0039】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

【0040】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載）。

【0041】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHiFive(インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0042】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の酵素を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の酵素が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0043】

【実施例】

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin, asialofetuin, bovine submaxillary mucin (BSM), α 1-acid glycoprotein, ovomucoid, lactosyl ceramide (LacCer), Gal1, GM3, GM1a, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,4GlcNAc, Triton CF-54はSigma社から購入した。Paragloboside, ラクトースは和光純薬から購入した。CMP-[14 C]-NeuAc (12.0 GBq/mmol)はAmersham Pharmacia Biotech社から購入した。Lacto-N-tetraose, Lacto-N-neotetraose, シアリダーゼ (NANase I, II) はGlyko Inc社から購入した。[α - 32 P] dCTPはNEN社から購入した。ヒトMultiple tissue cDNA panelはClontech社から購入した。BSM, α 1-acid glycoprotein, ovomucoidの脱シアル化(アシアロ)糖タンパク質は、これらを0.02N HCl中 80℃、1時間で処理することにより調製した

【 0 0 4 4 】

ヒトシアル酸転移酵素ST6Gal Iのアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンをNational Center for Biotechnology Informationのexpressed sequence tag (dbEST)のデータベースで検索したところ、GenBankTM accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052の各ESTクローンが得られた。これらについてはI. M. A. G. E. Consortiumより該当クローンを入手した。またそれらの塩基配列情報を利用して、さらにdbESTとヒトゲノムのHigh throughput genomic sequenceのデータベースを検索したところ、関連ESTクローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報が得られた (Accession Nos. H94068, AA514734, BF839115, AA210926, AA385852, H94143, BF351512 (以上ESTクローン), AC016994, AC005040, AC108049 (ゲノム配列))。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR)用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来cDNAを鋳型としてPCRを行い、ここで得られた増幅断片と入手ESTクローン由来のDNA断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを得た (図1A)。このcDNAは529アミノ酸からなる予測分子量60,157のII型膜タンパク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。なお膜貫通ドメインは疎水性分布図によりアミノ酸番号12-30の領域に存在することが予測された (図1B)。本タンパク質のアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在していた。また本タンパク質は既知ヒトシアル酸転移酵素の中ではST6Gal Iとアミノ酸レベルで最も高い相同性 (48.9%) を示したが、他のファミリーのシアル酸転移酵素とは21~36%程度の相同性を示したに過ぎなかった。なお以下に示すようにこのタンパク質は β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素ST6Gal IIと命名した。

【 0 0 4 5 】

本タンパク質の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。XhoIサイトを含む合成DNA, 5'-TCATCTACTTCACCTCGAGCAACCCCGCTG-3' (図1Aの塩基番号255-284に相当) (配列番号3) を用いて膜貫通ドメイン直下流にXh

oIサイトを導入し、これとクローニングベクターpBluescript II SK+由来のXhoIサイトをを用いてST6Gal IIのステム領域と活性ドメインをコードするXhoI断片を調製した。これを哺乳動物発現ベクターpcDSAのXhoIサイトに挿入した。この発現ベクターをpcDSA-ST6Gal IIと命名した。これはマウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドとStaphylococcus aureus protein A, およびST6Gal IIのアミノ酸番号33～529の領域からなる分泌型融合タンパク質をコードする。このpcDSA-ST6Gal IIとリポフェクトアミン(Invitrogen)を用いてCOS-7細胞でその一過性発現を行った(Kojima, N. et al. (1995) FEBS Lett. 360, 1-4)。ここでpcDSA-ST6Gal IIを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質をPA-ST6Gal IIと命名した。PA-ST6Gal IIはIgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech社)に吸着させて培地より回収した。シアル酸転移酵素活性はLeeらの方法に準じて以下のように行った(Lee, Y.-C. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11958-11967)。50 mM MESバッファー(pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5% Triton CF-54, 100 μM CMP-[¹⁴C]-NeuAc, 基質糖鎖(糖脂質の場合は0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は1 mg/mlになるように添加), およびPA-ST6Gal II懸濁液を含む反応液(10 μl)を37℃で3～20時間インキュベートし、その後、糖脂質についてはC-18カラム(Sep-Pak Vac 100 mg; Waters社)を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル60HPTLCプレート(Merck社)にスポットし、1-プロパノール：アンモニア水：水=6:1:2.5の展開溶媒(オリゴ糖用)またはクロロホルム：メタノール：0.02% CaCl₂=55:45:10の展開溶媒(糖脂質用)で展開した。糖タンパク質の場合はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性をBAS2000ラジオイメージアナライザー(フジフィルム)で可視化し、定量した。表1にPA-ST6Gal IIの基質特異性を示す。

【0046】

【表 1】

表 1 ST6Gal II の基質特異性
 PA-ST6Gal II を用いて様々な基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は 0.5 mg/ml に、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は 1 mg/ml になるようにした。相対活性は Galβ1,4GlcNAc の取り込み値を 100 として計算した。R は N 型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。

	相対活性(%)	
	ST6Gal II	ST6Gal I
オリゴ糖		
Galβ1,4GlcNAc	100*	100**
Galβ1,3GlcNAc	0	0
Galβ1,3GalNAc	0	0
Lactose	0	8.7
Lacto-N-tetraose	0	31.1
Lacto-N-neotetraose	86.2	101.6
糖タンパク質		
Fetuin	0	ND
NeuAcα2,3Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Thr		
NeuAcα2,3Galβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr		
NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R		
NeuAcα2,6GalNAc-O-Ser/Thr	3.9	ND
GlcNAcβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr	0	ND
NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-R		
NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-R	0	ND
NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-R	0	ND
NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R	1.2	ND
NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R	1.2	ND
糖脂質		
Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAcα2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
NeuAcα2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND

* , 1.03 pmol/h/ml medium. ** , 8.14 pmol/h/ml medium. NeuAc, N-acetylneuraminic acid. Cer, ceramide. ND, not determined.

【0047】

PA-ST6Gal IIはオリゴ糖に対しては、非還元末端にGal β 1,4GlcNAc構造をもつものに対してのみ活性を示した。またこの構造を持つと考えられる糖タンパク質に対しても弱い活性を示した。一方、糖脂質については、調べた範囲内ではPA-ST6Gal IIの基質となるものはなかった。また比較のためにヒトST6Gal Iのオリゴ糖に対する活性を調べたところ、Gal β 1,4GlcNAc構造をもつオリゴ糖のほかに、LactoseやLacto-N-tetraoseに対しても活性を示した。ST6Gal Iは糖タンパク質や糖脂質に対しても活性を示すことが知られているが、以上のことはST6Gal IIがST6Gal Iよりも基質特異性に関してより選択性が強いことを意味する。

【0048】

PA-ST6Gal IIによりGal β 1,4GlcNAcにシアル酸を転移した場合、その反応産物の導入シアル酸は α 2,3-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase I)では切断されなかったが、 α 2,3-, α 2,6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase II)では切断された(図2)。またこの反応産物はTLCにおいて6'-sialyl-N-acetyllactosamineと同じ移動度を示したこと、さらにガラクトシダーゼ処理ではTLCにおいて移動度に変化が認められなかったことから、 α 2,6結合を介してガラクトースにシアル酸が導入された6'-sialyl-N-acetyllactosamineであると考えられた。以上によりPA-ST6Gal Iはシアル酸を α 2,6-の結合様式でガラクトースに転移することが明らかになった。またその特に好ましい基質としては、非還元末端にGal β 1,4GlcNAc構造をもつオリゴ糖と考えられた。

【0049】

またST6Gal I, ST6Gal IIのヒト組織における発現パターンを、ST6Gal I特異的プライマー(5'-TTATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (配列番号4) および5'-CTTTGTACTTGTTTCATGCTTAGG-3' (配列番号5)、PCR増幅断片の大きさは372 bp)とST6Gal II特異的プライマー(5'-AGACGTCATTTTGGTGGCCTGGG-3' (配列番号6) (図1 Aの塩基番号1264-1286に相当) および5'-TTAAGAGTGTGGAATGACTGG-3' (配列番号7) (図1 Aの塩基番号1745-1765に相当)、PCR増幅断片の大きさは502 bp)を用いてPCR法で調べた(図3)。ST6Gal Iはほとんどの組織で発現していたが、S

T6Gal IIは小腸、大腸、胎児脳を除く組織での発現は非常に低いか、全く認められなかった。このことはST6Gal IとST6Gal IIが生体内で異なる役割を果たしていることを示唆する。

【0050】

【発明の効果】

本発明により新規酵素として β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有するので、Gal β 1,4GlcNAc構造をもつオリゴ糖などのガラクトース上に α 2,6の結合様式でシアル酸をより選択的に導入することが可能になった。本発明の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素ST6Gal IIは、本酵素が合成する特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療薬として、また癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させたり、糖鎖分解酵素の分解活性を阻害する研究用試薬などとして有用である。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Sugar chain synthetase

<130> A21272A

<160> 7

【0052】

<210> 1

<211> 529

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile

1	5	10	15
Phe	Ala	Trp	Gly
Leu	Leu	Phe	Leu
Leu	Ile	Phe	Ile
Tyr	Phe	Thr	Asp
20	25	30	
Ser	Asn	Pro	Ala
Glu	Pro	Val	Pro
Ser	Ser	Leu	Ser
Phe	Leu	Glu	Thr
35	40	45	
Arg	Arg	Leu	Leu
Pro	Val	Gln	Gly
Lys	Gln	Arg	Ala
Ile	Met	Gly	Ala
50	55	60	
Ala	His	Glu	Pro
Ser	Pro	Pro	Gly
Gly	Gly	Leu	Asp
Ala	Arg	Gln	Ala
Leu	65	70	75
80			
Pro	Arg	Ala	His
Pro	Ala	Gly	Ser
Phe	His	Ala	Gly
Pro	Gly	Asp	Leu
85	90	95	
Gln	Lys	Trp	Ala
Gln	Ser	Gln	Asp
Gly	Phe	Glu	His
Lys	Glu	Phe	Phe
100	105	110	
Ser	Ser	Gln	Val
Gly	Arg	Lys	Ser
Gln	Ser	Ala	Phe
Tyr	Pro	Glu	Asp
115	120	125	
Asp	Asp	Tyr	Phe
Phe	Ala	Ala	Gly
Gln	Pro	Gly	Trp
His	Ser	His	Thr
130	135	140	
Gln	Gly	Thr	Leu
Gly	Phe	Pro	Ser
Pro	Gly	Glu	Pro
Gly	Pro	Arg	Glu
145	150	155	160
Gly	Ala	Phe	Pro
Ala	Gln	Val	Gln
Arg	Arg	Arg	Val
Lys	Lys	Arg	
165	170	175	
His	Arg	Arg	Gln
Arg	Arg	Ser	His
Val	Leu	Glu	Glu
Gly	Asp	Asp	Gly
180	185	190	
Asp	Arg	Leu	Tyr
Ser	Ser	Met	Ser
Arg	Ala	Phe	Leu
Tyr	Arg	Leu	Trp
195	200	205	
Lys	Gly	Asn	Val
Ser	Ser	Lys	Met
Leu	Asn	Pro	Arg
Leu	Gln	Lys	Ala
210	215	220	
Met	Lys	Asp	Tyr
Leu	Thr	Ala	Asn
Lys	His	Gly	Val
Arg	Phe	Arg	Gly
225	230	235	240

Lys Arg Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ala Gln Leu Leu Cys Gln Leu Arg
 245 250 255
 Ser Arg Ala Arg Val Arg Thr Leu Asp Gly Thr Glu Ala Pro Phe Ser
 260 265 270
 Ala Leu Gly Trp Arg Arg Leu Val Pro Ala Val Pro Leu Ser Gln Leu
 275 280 285
 His Pro Arg Gly Leu Arg Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala
 290 295 300
 Ile Leu Asn Ser Ser Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val
 305 310 315 320
 Leu Arg Phe Asn Ser Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly
 325 330 335
 Asn Lys Thr Thr Ile Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Thr Asn Pro
 340 345 350
 Ser His His Phe Ile Asp Ser Ser Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val
 355 360 365
 Ala Trp Asp Pro Ala Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys
 370 375 380
 Lys Pro Asp Tyr Asn Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Gln Arg
 385 390 395 400
 Asn Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln
 405 410 415
 Leu Trp Asp Ile Ile Gln Glu Asn Thr Lys Glu Lys Ile Gln Pro Asn
 420 425 430
 Pro Pro Ser Ser Gly Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys
 435 440 445
 Arg Glu Val His Val Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu
 450 455 460
 Leu Cys His Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly

465 470 475 480
Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn

 485 490 495
Met Gly Thr Gln Gly Asp Leu His Arg Lys Gly Lys Val Val Leu Pro

 500 505 510
Gly Phe Gln Ala Val His Cys Pro Ala Pro Ser Pro Val Ile Pro His

 515 520 525

Ser

【 0 0 5 3 】

<210> 2

<211> 1800

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ggcgccgggactccctcctggcgcccccacagcctgtgcgcattcctgcattcctgccgcc 60
gcccgggacccgagccccggagggtgtccaggcgcggtgccaggcgggtactgtgcaggt 120
tcattctgccaccatctgcattaagacacaagggtgctgaccgcagagacctgcc 175
atg aaa cca cac ttg aag caa tgg aga caa cga atg ctt ttc gga ata 223
Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15
ttc gct tgg ggg ctc ctc ttt ttg ctg att ttc atc tac ttc acc gac 271
Phe Ala Trp Gly Leu Leu Phe Leu Leu Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asp
 20 25 30
agc aac ccc gct gag cct gta ccc agc tcc ctc tcc ttc ctg gag acc 319
Ser Asn Pro Ala Glu Pro Val Pro Ser Ser Leu Ser Phe Leu Glu Thr
 35 40 45
agg agg ctc ctg ccg gtg cag ggg aag cag cgg gcc atc atg ggc gcc 367
Arg Arg Leu Leu Pro Val Gln Gly Lys Gln Arg Ala Ile Met Gly Ala
 50 55 60

gca cat gag ccc tcc ccg cct ggg ggc ctg gac gca cgc cag gcg ctg 415
 Ala His Glu Pro Ser Pro Pro Gly Gly Leu Asp Ala Arg Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 ccc cgc gcc cac cca gcc ggt tcc ttt cat gcg ggg cct gga gac ctg 463
 Pro Arg Ala His Pro Ala Gly Ser Phe His Ala Gly Pro Gly Asp Leu
 85 90 95
 cag aaa tgg gcc cag tcc caa gat ggg ttt gaa cat aaa gag ttt ttt 511
 Gln Lys Trp Ala Gln Ser Gln Asp Gly Phe Glu His Lys Glu Phe Phe
 100 105 110
 tca tcc cag gtg ggg aga aaa tct caa agt gct ttc tac ccg gag gat 559
 Ser Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu Asp
 115 120 125
 gac gac tac ttt ttt gct gct ggt cag cca ggg tgg cac agc cac act 607
 Asp Asp Tyr Phe Phe Ala Ala Gly Gln Pro Gly Trp His Ser His Thr
 130 135 140
 cag ggg aca ttg gga ttc cct tcc ccc ggg gag cca ggc cca cgg gag 655
 Gln Gly Thr Leu Gly Phe Pro Ser Pro Gly Glu Pro Gly Pro Arg Glu
 145 150 155 160
 ggg gct ttt ccg gct gca cag gtc cag agg agg cgg gtg aag aag agg 703
 Gly Ala Phe Pro Ala Ala Gln Val Gln Arg Arg Arg Val Lys Lys Arg
 165 170 175
 cac cgg agg cag aga agg agc cac gtg ttg gag gag ggc gac gac ggc 751
 His Arg Arg Gln Arg Arg Ser His Val Leu Glu Glu Gly Asp Asp Gly
 180 185 190
 gac agg ctg tac tcc tcc atg tcc agg gcc ttc ctg tac cgg ctc tgg 799
 Asp Arg Leu Tyr Ser Ser Met Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp
 195 200 205
 aag ggg aac gtc tct tcc aaa atg ctg aac ccg cgc ctg cag aag gcg 847
 Lys Gly Asn Val Ser Ser Lys Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala

210 215 220
 atg aag gat tac ctg acc gcc aac aag cac ggg gtg cgc ttc cgc ggg 895
 Met Lys Asp Tyr Leu Thr Ala Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Gly
 225 230 235 240
 aag cgg gag gcc ggg ctg agc agg gca cag ctg ctg tgc cag ctg cgg 943
 Lys Arg Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ala Gln Leu Leu Cys Gln Leu Arg
 245 250 255
 agc cgc gcg cgc gtg cgg acg ctg gac ggc acc gag gcg ccc ttt tct 991
 Ser Arg Ala Arg Val Arg Thr Leu Asp Gly Thr Glu Ala Pro Phe Ser
 260 265 270
 gcg ctg ggc tgg cgg cgc ctg gtg ccc gcc gtg ccc ctg agc cag ctg 1039
 Ala Leu Gly Trp Arg Arg Leu Val Pro Ala Val Pro Leu Ser Gln Leu
 275 280 285
 cac ccc cgc ggc ctg cgc agc tgc gct gtc gtc atg tct gca ggc gca 1087
 His Pro Arg Gly Leu Arg Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala
 290 295 300
 atc ctc aac tct tcc ttg ggc gag gaa ata gat tct cat gat gcg gtt 1135
 Ile Leu Asn Ser Ser Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val
 305 310 315 320
 ttg aga ttt aac tct gct cct aca cgt ggt tat gag aaa gat gtt ggg 1183
 Leu Arg Phe Asn Ser Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly
 325 330 335
 aat aaa acc acc ata cgc atc att aat tcg cag att ctg acc aac ccc 1231
 Asn Lys Thr Thr Ile Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Thr Asn Pro
 340 345 350
 agc cat cac ttc att gac agt tca ctg tat aaa gac gtc att ttg gtg 1279
 Ser His His Phe Ile Asp Ser Ser Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val
 355 360 365
 gcc tgg gac cct gcc cca tat tcc gca aat ctt aac ctg tgg tac aaa 1327

Ala Trp Asp Pro Ala Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys

370

375

380

aaa ccg gat tac aac ctg ttc act cca tat att cag cat cgt cag aga 1375

Lys Pro Asp Tyr Asn Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Gln Arg

385

390

395

400

aac cca aat cag cca ttt tac att ctt cat cct aaa ttt ata tgg cag 1423

Asn Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln

405

410

415

ctc tgg gat att atc cag gag aac act aaa gag aag att caa cca aac 1471

Leu Trp Asp Ile Ile Gln Glu Asn Thr Lys Glu Lys Ile Gln Pro Asn

420

425

430

cca cca tct tct ggt ttc att gga atc ctc atc atg atg tcc atg tgc 1519

Pro Pro Ser Ser Gly Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys

435

440

445

aga gag gtg cac gtg tat gaa tat atc cca tcc gtg cgg cag acg gag 1567

Arg Glu Val His Val Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu

450

455

460

ctg tgc cac tac cac gag ctg tac tac gac gca gcc tgc acc ctc ggg 1615

Leu Cys His Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly

465

470

475

480

gcg tac cac cca cta ctc tat gag aag ctc ctg gtg cag cgc ctg aac 1663

Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn

485

490

495

atg ggc acg cag ggg gat ttg cat cgc aag ggc aag gtg gtt ctt cct 1711

Met Gly Thr Gln Gly Asp Leu His Arg Lys Gly Lys Val Val Leu Pro

500

505

510

ggc ttc cag gcg gtg cac tgc cct gca cca agt cca gtc att cca cac 1759

Gly Phe Gln Ala Val His Cys Pro Ala Pro Ser Pro Val Ile Pro His

515

520

525

tct taaaaagggtttcttggaatcaatgtgcaatggtaca

1800

Ser

【 0 0 5 4 】

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

tcattactt cacctcgagc aaccccgctg 30

【 0 0 5 5 】

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ttatgattca caccaacctg aag 23

【 0 0 5 6 】

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ctttgtactt gttcatgctt agg 23

【 0 0 5 7 】

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

agacgtcatt ttggtggcct ggg

23

【 0 0 5 8 】

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ttaagagtgt ggaatgactg g

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 A は、ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。図 1 B は、ST6Gal II の疎水性分布図を示す。N 末端側の大きな疎水性領域は膜貫通ドメインと予測される。

【図 2】

図 2 は、PA-ST6Gal II により Gal β 1,4GlcNAc に導入されたシアル酸の結合様式の解析を示す。PA-ST6Gal II により Gal β 1,4GlcNAc を [^{14}C]-NeuAc でシアル化し

(レーン1)、それを α 2,3-結合特異的シアリダーゼ(NANase I, レーン2)、 α 2,3-, α 2,6-結合特異的シアリダーゼ(NANase II, レーン3)で処理した反応産物をHPTLCで展開した結果を示す。

【図3】

図3は、ST6Gal I, ST6Gal IIのヒト組織における発現パターンの解析を示す。ST6Gal I, ST6Gal II特異的プライマーとヒト組織のMultiple tissue cDNA panel (Clontech)を用い、両遺伝子の発現パターンをPCRで解析した。PCRは94℃1分、50℃1分、72℃1分30秒を1サイクルとし、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)遺伝子については25サイクル、ST6Gal I, ST6Gal II遺伝子については40サイクル行って、反応産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。

【書類名】

図面

【図 1】

図1

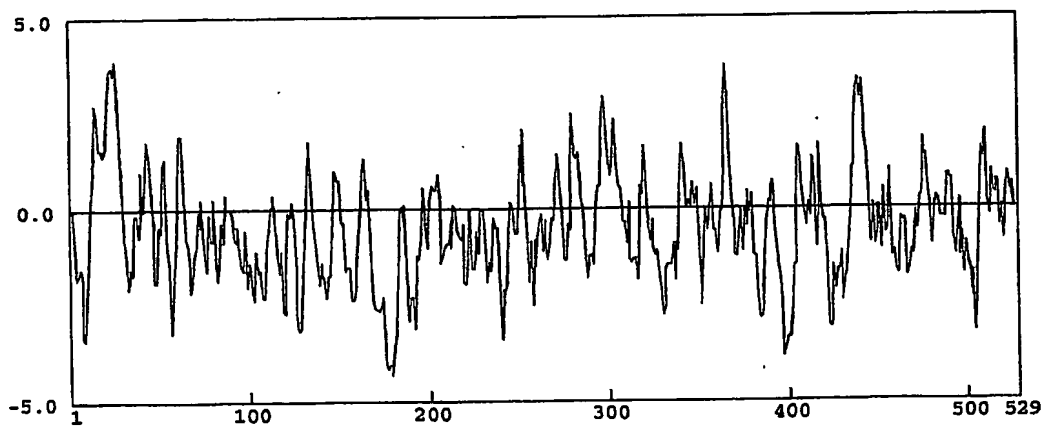
A

```

ggcgccgggactccctcctggccgccacagcctgtgcgcattctctgattctcctgccgcggcgccgggacccgagcccccggagggtgtccaggcgcgggtgc 100
caggcgggtactgtgcagggttcattcttgcacccatctgcattaaagacacaaggtgtgcgcgcagagacctgcaatgaaaccacacttgagcaatgga 200
M K R P H L K Q W R 9
gacaacgaatgcttttcggaatattcgcttggggggctcctcttttctgattttcatctacttcccgacagcaaccccgctgagcctgtaccagctc 300
Q R M L F G I P A W G L L P L L I F I Y F T D S N P A E P V F S S 42
cctctccttctcctggagaccaggaggtcctgcggtgcaggggaagcagcgggcatcatgggcgcgcacatgagccctcccgctgggggctggac 400
L S P L E T R R L L P V Q G K Q R A I M G A A H E P S P F G G L D 75
gcagccaggcgtgcgcgcgcacccagcgggtcctttcatgcggggctggagacctgcagaaatgggcccagtcaccaagatgggtttgaacata 500
A R Q A L P R A H P A G S F H A G P G D L Q K W A Q S Q D G F E H K 109
aagagttttttcatcccggtggggagaaaatctcaaggtcctttctacccggaggatgacgactactttttgctgctggtcagccagggtggcacag 600
E F P S S Q V G R K S Q S A P Y P E D D D Y F F A A G Q F G W H S 142
ccacactcaggggacattgggattcccttccccggggagccagggccacgggggggcttttccggctgcacaggtccagaggggggggtgaagaag 700
H T Q G T L G F P S P G E F G P R E G A F P A A Q V Q R R V K K 175
aggcaccggaggcagagaaggagccagctgttggaggaggggcagcagcgccagggctgtactcctcctatgtccagggccttctgtaccggctctgga 800
R H R R Q R R S H V L E E G D D G D R L Y S S M S R A F L Y R L W K 209
aggggaacgtctcttccaaaatgtaaccccgccctgcagaaggcgatgaaggattacctgacgcccaacaagcaggggtgcgcttccgggggaagcg 900
G N V S S K M L N P R L Q K A M R D Y L T A N K H G V R F R G K R 242
ggaggccgggtgcagcagggcacagctgtgtgcagctgcggagccgcgcgcgtgcggacgctggagggcaccgaggcgccctttctgcgctgggc 1000
E A G L S R A Q L L C Q L R S R A R V R T L D G T E A P F S A L G 275
tggcgccgctgggtgcccgcgctgccctgagccagctgcaccccggggctgcgcagctgcgctgtctgtctgtctgtctgtctgtctgtctgtctgt 1100
W R R L V P A V P L S Q L H P R G L R S C A V V M S A G A I L N S S 309
ccttgggcgaggaaatagattctcatgatgcggttttgagatttaactctgtcctacacgtggttatgagaagatgttgggaataaaaccaccatagc 1200
L G E E I D S H D A V L R F N S A P T R G Y E K D V G N K T T I R 342
catcattaattgcagattctgaccaaaccagccatcattcattgacagttcactgtataaagacgtcatttttgggtggcctgggaccctgtcccacat 1300
I I N S Q I L T N P S H H F I D S S L Y K D V I L V A W D P A F Y 375
tccgcaaatcttaacctgtgtgtacaaaaaacggattacaacctgttccactccatatactcagcatcgtcagagaaaccccaatcagccattttacatc 1400
S A N L N L W Y K K P D Y N L F T P Y I Q H R Q R N P N Q P F Y I L 409
ttcatcctaatttatatggcagctctgggatattatccaggagaacactaaagagaagattcaacaaacccaccatctctgttttcattggaatcct 1500
H F K P I W Q L W D I I Q E N T K E K I Q P N P F S S G F I G I L 442
catcatgatgtccatgtgcagagaggtgcacgtgtatgaatatatccatcogtgcggcagacggagctgtgccactaccagagctgtactacgacgca 1600
I M M S M C R E V H V Y E Y I P S V R Q T E L C H Y H E L Y Y D A 475
gcctgcacctcggggcgatccaccactactctatgagaagctcctggtgcagcgcgtgaacatgggcacgcagggggatttgcatcgcaagggcaagg 1700
A C T L G A Y H P L L Y E K L L V Q R L N H G T Q G D L H R K G K V 509
tggttcttctggcttccaggcgggtgcactgcctgcaccaagtcagtcattccacactctttaaagggtttcttgggaatcaatgtgcaatggtaca 1800
V L P G F Q A V H C P A P S P V I P H S * 529

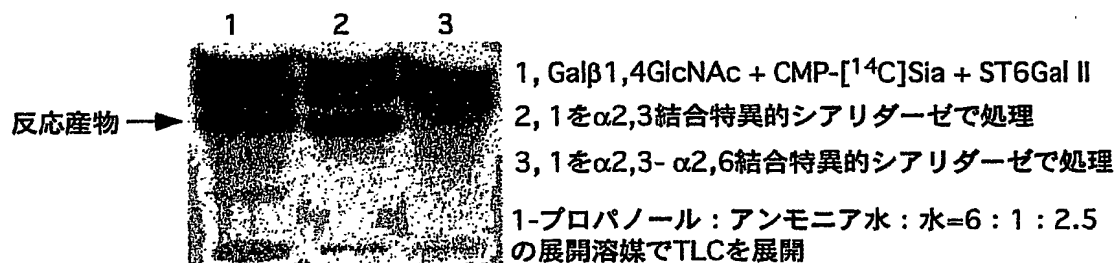
```

B



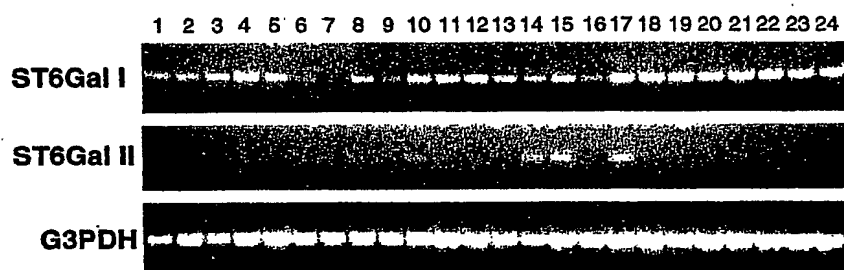
【図 2】

図2



【図 3】

図3



1, 脳; 2, 心臓; 3, 肺; 4, 肝臓; 5, 腎臓; 6, 脾臓; 7, 胎盤; 8, 骨格筋;
 9, 精巣; 10, 前立腺; 11, 胸腺; 12, 脾臓; 13, 白血球; 14, 小腸;
 15, 大腸; 16, 卵巣; 17, 胎児脳; 18, 胎児心臓; 19, 胎児肺;
 20, 胎児肝臓; 21, 胎児腎臓; 22, 胎児脾臓; 23, 胎児胸腺; 24, 胎児筋

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オリゴ糖上のGal β 1,4GlcNAc構造に対してより選択性の高い基質特異性を示す新規 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素および該酵素をコードするDNAを提供すること。

【解決手段】 以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1,4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2,6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1,4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1,3N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.